云南植物研究 1987; 9 (4): 455—462
Acta Botanica Yunnanica

烟草花叶病毒外壳蛋白嵌合基团的重组

王 钧[1,2] 胡运乾[1] 陈菀苑[3]

(1.中国科学院昆明植物研究所，昆明)
(2.中国科学院上海植物生理研究所，上海)
(3.复旦大学，上海)

摘要 普通烟草花叶病毒外壳蛋白基因已和花椰菜花叶病毒35S启动子及3′未端重组成嵌合基因。在连接了用于筛选在土壤杆菌中导入外源基因的新霉素磷酸转移酶Ⅰ（NPT Ⅰ）基因和用于筛选在植物细胞中导入外源基因的嵌合的新霉素磷酸转移酶Ⅱ（NPT Ⅱ）基因后，已导入一个去致瘤基因的Ti载体T-DNA区中。这种在Ti载体T-DNA区带嵌合的烟草花叶病毒外壳蛋白基因的土壤杆菌菌株，可以用来转化植物。观察在转化植物中表达的这种外壳蛋白能否延缓或减轻烟草花叶病毒对它们的危害。

关键词 烟草花叶病毒；外壳蛋白；基因重组；Ti质粒

普通烟草花叶病毒引起的烟草花叶病在云南烟区普遍流行，至今没有有效的防治办法。

利用病毒弱毒株预感染来延缓和减轻强毒株对作物危害是农业上减轻病毒病害造成的经济损失的一种办法。弱毒株的这种作用称为交叉保护作用[1]。在田间使用这种方法有下列潜在危险：对一种作物是弱毒的病毒株，对另一种作物可能是致命的；弱毒株有突变成强毒株的可能。这就限制了这种方法的推广。

对于交叉保护的机制，曾提出过多种假说。用外壳蛋白包裹病毒RNA或用互补的负链RNA抑制病毒RNA活性就是其中的两种[2]。如果这些假说正确，则通过植物基因工程在植物中表达病毒外壳蛋白或负链RNA，就可以避开用弱毒株预感染可能引起的潜在危险，使转化后的植物获得一定程度的抗病毒特性。Bevan等人[3]和Abel等人[4]已在烟草中表达导入的烟草花叶病毒外壳蛋白基因。Abel等人[4]还证实在转化的烟株中表达的烟草花叶病毒外壳蛋白的确延缓了这种病毒对植株的危害。

我们正在寻找通过植物基因工程抗植物病毒病的途径。交叉保护是我们拟用的一种途径。这里报道我们把普通烟草花叶病毒外壳蛋白基因和花椰菜花叶病毒35S启动子和3′未端组合成嵌合基因和把这个嵌合基因导入Ti质粒T-DNA区的重组工作。利用这个重组基因转化植物的工作正在进行中。

1987-03-30收稿

材料和方法

1.材料

菌株：大肠杆菌：JM101，GJ23。土壤杆菌：带pGV3850的C58Rif^{r}Cm^{r}突变株。

质粒：pCK501（王钧等未发表资料），pDH51[5]，pGV1103neo和pGV3850[6]。

药品：工具酶为Boehringer产品，PEG8000为Pharmacia产品。琼脂糖为Serva产品，其它绝大多数为国产试剂。

2.方法

小规模质粒提取、大规模质粒纯化、酶切片段0.8%或1.5%琼脂糖电泳、DNA片段8%聚丙烯酰胺凝胶电泳和电洗脱、重组质粒转化大肠杆菌Southern DNA转移和DNA-DNA分子杂交的方法，均参照Maniatis等人的手册[7]；但琼脂糖电泳一般用Loening缓冲液[8]。工具酶的使用参照Boehringer说明书；但T4-DNA连接酶的使用参照BRL推荐的方法[9]。重组质粒经接合转移、体内重组插入T-DNA区的方法参照Zambryski等人的资料[9]。土壤杆菌总DNA提取参照Dhaese等人的方法[10]，但作了如下变动：悬浮的菌液用0.2N NaOH和1% SDS在室温下破壁十分钟；乙醇沉淀后以含0.5mol Tris（pH7.0）的缓冲液溶解、剪切、用酚和氯仿去蛋白后，再沉淀。为了使这样提出的粗DNA容易被内切酶降解，参照了Taylor和Powell的方法[11]，用CTAB处理，去除粗提物中干扰反应的多糖；经CTAB处理后的DNA沉淀，溶解后用氯仿反复抽去残存的CTAB，溶液中的DNA，经乙醇沉淀后备用。

结果和讨论

1.待克隆烟草花叶病毒外壳蛋白基因片段的确定

我们已证明云南烟田和上海地区分离的普通烟草花叶病毒外壳蛋白与RNA序列已知的普通烟草花叶病毒OM株外壳蛋白同源[13, 14]。本文外壳蛋白基因片段取自带OM株外壳蛋白基因cDNA的质粒pCK501。

植物正链RNA病毒mRNA 5′非转译区富含碱基A和U。烟草花叶病毒外壳蛋白mRNA是转译活性很强的mRNA。它的5′非转译区有九个碱基，八个是A和U[12]。Bevan等[3]，Abel等[4]重组这个基因时用Dra I-Apa I片段，切除了5′端非转译区四个A、U碱基。我们选用Hinf I 667bp片段，保留了5′端完整的非转译区，另外附加五个碱基，其中三个是A和U；3′端只切去二十七个碱基[10]。预期在和花椰菜花叶病毒35S启动子及3′末端组成嵌合基因后，在植物中表达的mRNA，既可能有相当高的稳定性，又可能有高转译活性。

pCK501含OM株3′端Apa I到Hind Ⅲ间1.3kb片段。经Hinf I降解，聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，含外壳蛋白基因的Hinf I 667bp片段，位于1.6kb和602bp片段之间。切下的片段经电泳洗脱、乙醇沉淀，就用于重组工作。

烟草花叶病毒OM株3′端外壳蛋白基因cDNA碱基序列见图1。

```
                                                                 ↓                                 ↓
GAACAAGAAC TATAGAAATG TTAAGGATTT TGGAGGAATG AGTTTTAAAA AGAATAATTT AATCGATGAT GATTCGGAGA
                                                   Dra I                            Hinf I
                          ┌─mRNA     ┌──────CP
              ↓      ↓        ↓
CATCTGTCGC CGAATCGGAT TCGTTTTAAA TATGTCTTAC AGTATCACTA CTCCATCTCA GTTCGTGTTC TTGTCAGCAG
           Hinf I Hinf I  Dra I

CGTGGGCCGA CCCAATAGAG TTAATTAATT TATGTACTAA TGCCTTAGGA AATCAGTTTC AAACACAACA AGCTCGAACT

GTCGTTCAAA GACAATTCAG TGAGGTGTGG AAACCTTCAC CACAAGTAAC TGTTAGGTTC CCTGACAGTG ACTTTAGGTT

GTACAGGTAC AATGCGGTAT TAGACCCGCT AGTCACAGCA CTGTTAGGTG CATTTGACAC TAGAAATAGA ATAATAGAAG

TTGAAAATCA GGCGAACCCC ACAACTGCCG AAACGTTAGA TGCTACTCGT AGAGTAGACG ACGCAACGGT GGCCATAAGG
                                                                       ↓          ↓
AGCGCTATAA ATAATTTAGT AGTAGAATTG ATCAGAGGAA CCGGATCTTA TAATCGGAGC TCTTTCGAGA GCTCTTCTGG
                                                                     Sac I      Sac I

TTTGGTTTGG AACTCTGGTC CTGCAACTTG AGGTAGTCAA GATGCATAAT AAATAACGGA TTGTCTCCGT AATCACACGT

GGTGCGTACG ATTACGCATA GTGTTTTTCC CTCCACTTAA ATCGAAGCGT TGTGTCTTGG ATCGCGCGGG TCAAATGTAT
                                                 ↓                                ↓
ATGGTTCATA TACATCCGCA GGCACGTAAT AAAGCGAGGG GTTCGAATCC CCCCGTTACC CCCGGTAGGG GCCCA
                                              Hinf I                            Apa I
```

图 1　烟草花叶病毒OM株 3′端cDNA碱基序列

Figure 1　The 3′ terminal sequence of the cDNA of tobacco mosaic virus strain OM.

2.烟草花叶病毒外壳蛋白嵌合基因的重组

为了使整合在植物染色质基因组上的烟草花叶病毒外壳蛋白基因能转录、加工成mRNA，需要把它和能在植物中起作用的启动子和 3′末端DNA序列相结合，组成嵌合基因。花椰菜花叶病毒35S启动子是迄今已知能用于烟草的最强的植物转录启动子之一。pDH51含这个启动子和它的 3′末端。在启动子后相当于mRNA 5′帽的碱基和 3′末端之间，接有一个聚核苷酸接头。整个嵌合片段插在pUC18聚核苷酸接头之中，在这个片段和 pUC18连接处，两端各有一个EcoR Ⅰ切口[5]。烟草花叶病毒外壳蛋白Hinf Ⅰ片段，经Klenow酶填平后插在pDH51聚核苷酸接头Sma Ⅰ切口中，得pCK401和pCK402。pCK401中外壳蛋白基因读码顺序和35S启动子转录方向相同，经Dra Ⅰ和Hind Ⅲ酶切，含860bp和 1645bp 特异片段。pCK402 中外壳蛋白基因读码顺序与35S启动子转录方向相反，经Dra Ⅰ和Hind Ⅲ酶切，含200bp和2305bp特异片段。

为了通过土壤杆菌Ti质粒导入植物染色体组，嵌合的烟草花叶病毒外壳蛋白基因还需插入一个合适的中间载体。我们将用T-DNA区致癌基因被 pBR322取代物的Ti质粒pGV3850[6]把外壳蛋白基因导入植物，相应地选用pGV1103neo作为中间载体，它除了带有与pGV3850的T-DNA区同源的pBR322 EcoR Ⅰ-Sal Ⅰ 3.7kb片段外，还有一个能在土壤杆菌中表达的新霉素磷酸转移酶Ⅰ（NPT Ⅰ）基因和在植物中表达的新霉素磷酸转移酶Ⅱ(NPT Ⅱ)嵌合基因。它们分别是从土壤杆菌群中筛选Ti质粒T-DNA区带外源基因的菌株和从植物细胞群中筛选转化细胞所需要的筛选基因。pCK401经EcoR Ⅰ酶切取带嵌合基因的 1.38kb片段，和经 EcoR Ⅰ酶切、碱性磷酸酯酶处理的 pGV1103neo重组，得pCK403和pCK404。pCK403中外壳蛋白基因35S启动子取向和NPT Ⅱ基因

NOS启动子取向相同。经Apa Ⅰ和Sac Ⅰ双酶切，含2.0kb和6.5kb特异片段。pCK404中外壳蛋白基因35S启动子取向和NPT Ⅱ基因NOS启动子取向相反。经Apa Ⅰ和Sac Ⅰ双酶切，含3.0kb和5.5kb特异片段。pCK402用和pCK401相同的操作，得pCK406，其中35S启动子取向和NPT Ⅱ嵌合基因上NOS启动子取向相反。

两步重组流程见图2。pCK403和pCK404的酶切电泳图谱见图3。

3.嵌合的烟草叶病毒外壳蛋白基因插入Ti质粒T-DNA区

带嵌合的外壳蛋白基因的重组质粒，均含ColE Ⅰ复制子和Bam座位，单独不能进入土壤杆菌细胞。大肠杆菌GJ23含R64drd11和pGJ28两个辅助质粒。R64drd11为去

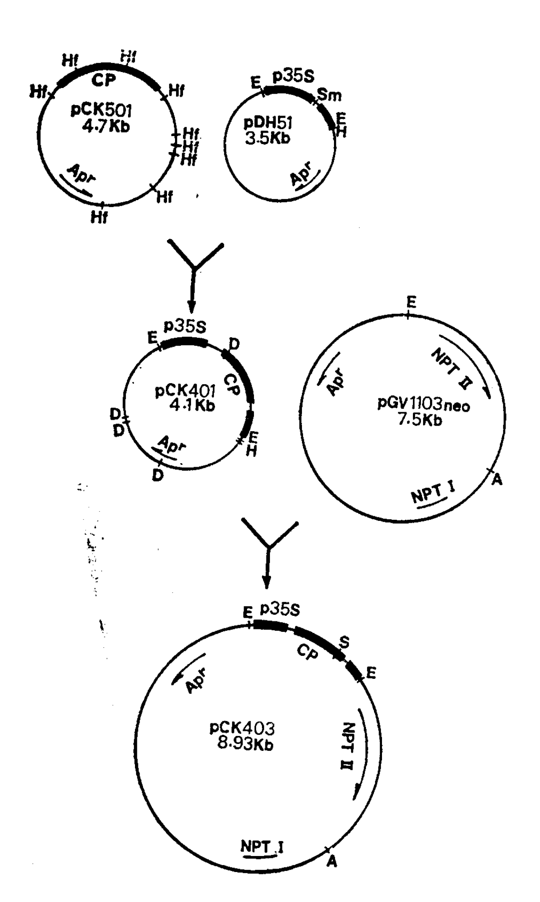


图2 带烟草花叶病毒外壳蛋白基因的中间载体pCK403的组建

Figure 2 Construction of the intermediate plasmid pCK403 containing chimeraic coat protein gene of tobacco mosaic virus. A = Apa Ⅰ, D = Dra Ⅰ, E = EcoR Ⅰ, Sm = Sma Ⅰ, H = Hind Ⅲ, Hf = Hinf Ⅰ, S = Sac Ⅰ, p35S = 35S promoter of cauliflower mosaic virus, CP = coat protein gene of tobacco mosaic virus.

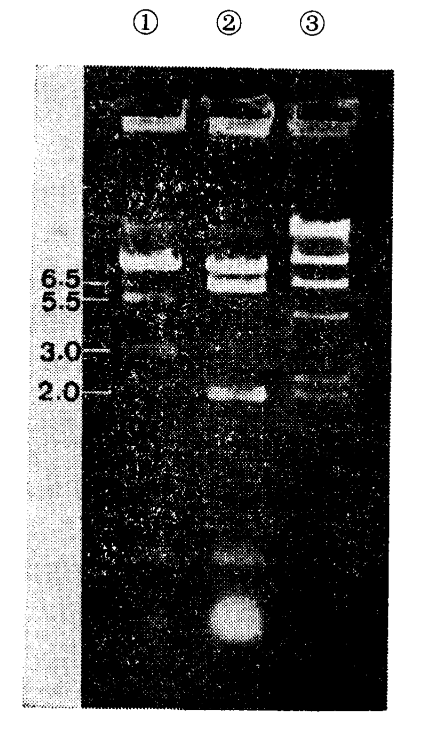


图3 pCK403和pCK404经Apa Ⅰ和Dra Ⅰ酶切后的电泳图谱

Figure 3 The electrophoresis pattern of pCK403 and pCK404 after Apa Ⅰ and Sac Ⅰ digestion.

0.8% agarose gel, Loening buffer

1. pCK404, 2. pCK403, 3. Hind Ⅲ digested λDNA

转移阻遏的Ⅰ型质粒，pGJ28含CoIE 1复制子和mob座位。带重组质粒的大肠杆菌和GJ23接合转移后，在这两个辅助质粒的帮助下，这些质粒能转移到土壤农杆菌中去。带外壳蛋白基因的质粒使大肠杆菌具Ap^r表型。而R64drd11和pGJ28分别使大肠杆菌有Tc^r、Sm^r和Km^r的表型[15]。经接合转移，用含Tc、Sm、Km和Ap的培养基筛选，得到GJ23×pCK403、GJ23×pCK404和GJ23×pCK406，它们都具Tc^r、Sm^r、Km^r、Ap^r、Rif^s的表型，含三个质粒。

pGV3850位于土壤农杆菌C58的Rif^r突变株中。它的T-DNA区除带pBR322 Hind Ⅲ片段外，还保留Nopaline合酶等T-DNA残留DNA。这个土壤杆菌有Rif^r、Ap^r、Sm^s、Tc^s、Km^s和3-酮基乳糖正反应的表型[6]。通过和GJ23×pCK403等接合转移，把带外壳蛋白基因的质粒等质粒导入土壤杆菌。由于这些质粒缺乏在土壤杆菌中增殖所要的复制子，除非通过同源重组插入宿主DNA，随着宿主增殖，它们将很快地从土壤杆菌中丢失。由于pCK403、pCK404、pCK406含有能和pGV3850 T-DNA区同源重组的pBR322片段，又带有能在土壤杆菌中表达的NPT Ⅰ基因，经过接合转移，同源重组，用含Rif、Ap、Km的培养基初筛，用含Tc、Sm的培养基及3-酮基乳糖反应复筛，就把大肠杆菌、未参加同源重组的pGV3850排除出去，得到T-DNA区带外壳蛋白基因的pACK403、pACK404和pACK406等Ti质粒。带这些Ti质粒的土壤杆菌都有Rif^r、Ap^r、Km^r、Tc^s、Sm^s和3-酮基乳糖正反应的表型。提取带这些Ti质粒的土壤杆菌总DNA，用EcoRI完全降解，TBE缓冲液下1%琼脂糖凝胶电泳分片段，Southern DNA转移，以^{32}P标记的外壳蛋白基因探针或pBR322探针杂交，确证这些Ti质粒T-DNA区含外壳蛋白基因，结构与预期的一致。有仅能和外壳蛋白基因探针杂交的嵌合外壳蛋白基因的1.38 kb EcoRI片段和只能和pBR322探针杂交的7.4kb和12.8kb片段，而pGV 3850只含能和pBR322探针杂交的12.8kb片段。嵌合的烟草花叶病毒外壳蛋白基因导入pGV3850的T-DNA区的同源重组和过程和得到的pACK403、pACK404、pACK406 T-NDA区结构见图4。证明T-DNA区这种结构的DNA-DNA分子杂交结果见图5所列图谱。

我们预测用pACK403、pACK404转化植物，就能在植物中累积烟草花叶病毒外壳蛋白，延缓和减轻烟草花叶病毒对这些植物的危害。

致谢　杜良成参加了体内重组工作；本工作得到云南省科委经费支持。

A

NPT Ⅱ
CP
pCK403
404
406
NPT Ⅰ
Apr

pGV3850
Apr

NPT Ⅰ
Apr
NPT Ⅱ
CP
pACK403
404
406
Apr

B

1 E S HS E E

2 HE S H

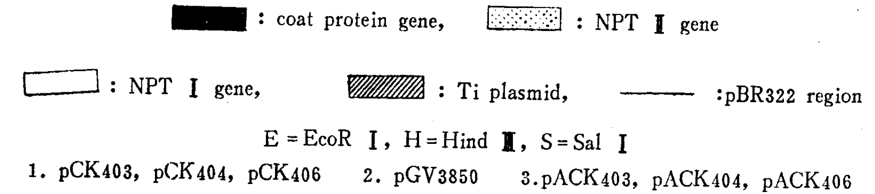
3 HE S HS E E S H

图 4 A：通过pACK403，pACK404，pACK406，和pGV3850的pBR322片段间的DNA同源重组把嵌合的外壳蛋白基因导入pGV3850的T-DNA区。

B：插入嵌合的外壳蛋白基因前后pGV3850的pBR322区结构

Figure 4 A：Insertion of the chimeric coat protein gene into T-DNA region of pGV3850 by DNA recombination betweem homologous pBR322 fragments of pCK403, pCK404, pCK406 and pGV3850.

B：The Structure of pGV3850 pBR322 region before and after insertion of the chimeric coat protein gene



E = EcoR Ⅰ, H = Hind Ⅲ, S = Sal Ⅰ

1. pCK403, pCK404, pCK406 2. pGV3850 3. pACK403, pACK404, pACK406

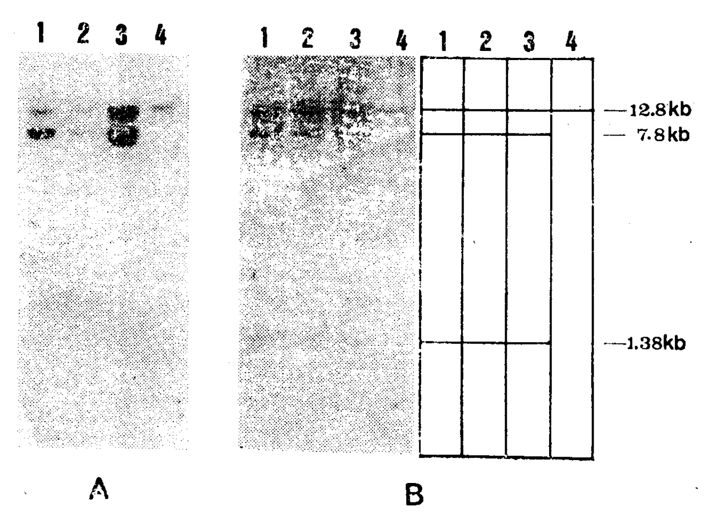


图5　含外壳蛋白基因的土壤杆菌Ti质粒T-DNA区的Southern分子杂交分析。土壤杆菌总DNA用限制性内切酶EcoR Ⅰ降解，片段用1%琼脂糖凝胶分离，电泳后的凝胶DNA转移移到硝酸纤维素薄膜上，用放射性探针pBR322(A)或外壳蛋白基因探针有pBR322的污染(B)杂交。

Figure 5　Southern blot analysis of the T-DNA structure of Ti plasmids in agrobacteria containing TMV coat protein gene. Total DNA of agrobacteria was digested with endonuclease EcoR I and separated on a 1% agarose gel. The gel was blotted onto nitrocellulose filter and hybridized to radioactive probe pBR322(A) or coat protein gene probe(B). 1. pACK404, 2. pACK403, 3. pACK406, 4. pGV3850.

参考文献

1 Broadbent L. *Ann Rev Phytopathol* 1976; **14**:75—96
2 Palukaitis P, Zaitlin M. In Plant-Microbe Interactions: Molecular and Genetic Prospectives. Kosuge T, Nester E W Eds. New York: Macmillam, 1984: 420—429
3 Beven M W et al. *EMBO J* 1985; **4**: 1921—1926
4 Abel P P et al. *Science* 1986; **232**:738—743
5 Pietrzak M et al. *Nucl Acids Res* 1986; **14**: 5857—5868
6 Zambryski P et al. *EMBO J* 1983; **2**: 2143—2150
7 Maniatis T et al. Molecular Cloning. New York: Cold Spring Horbor Lab, 1982
8 Loening U E. *Biochem J* 1967; **102**: 251—257
9 King P V, Blakesley R W. *Focus* 1986; **8**(1): 1—2
10 Dhaese P et al. *Nucl Acids Res* 1979; **7**: 1837—1849
11 Taylor B, Powell A. *Focus* 1982; **4**(3): 4—6
12 Takamatsu N et al. *Nucl Acids Res* 1983; **11**: 3767—3778
13 陈文岗，王钧. 待发表
14 王钧等. 待发表
15 Van Haute E et al. *EMBO J* 1983; **2**: 411—417
16 李英，王钧. 云南植物研究　1982; **4**: 83—87

RECOMBINATION OF A CHIMERAIC COAT PROTEIN GENE OF TOBACCO MOSAIC VIRUS

Wang Jun[1,2], Hu Yunqiang[1], Chen Wanyuan[3]

(1. *Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming*)
(2. *Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica, Shanghai*)
(3. *Fudan University, Shanghai*)

Abstract The coat protein gene of tobacco mosaic virus strain OM have been combined with the 35S promoter and terminator of cauliflower mosaic virus as a chimeric gene. After insertion of this gene into the plasmid pGV1103neo containing a NPT I gene which can express in agrobacteria and a chimeric NPT II gene which can express in plant, this chimeraic coat protein gene have been inserted into the T-DNA region of a modified Ti plasmid pGV3850. The agrobacteria with this Ti plasmid containing the coat protein gene of tobacco mosaic virus is suitable to transform plants and to see if the expressed coat protein can delay or decrease the symptom caused by tobacco mosaic virus in transgenic plant.

Key words Tobacco Mosaic Virus; Coat protein; Gene recombination; Ti plasmid